

AD

English Abstract for DE 19548476

Compound containing protein from TGF-beta superfamily - has bone and/or cartilage inducing activity, useful in treatment of, e.g. osteoporosis, bone damage, Paget's disease and osteoarthritis

Patent Assignee: BIOPHARM GES BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKL (BIOP-N)

Inventor: BECHTOLD R; HOTTEN G; PAULISTA M; POHL J; HOETTEN G

Number of Countries: 074 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19548476	A1	19970626	DE 1048476	A	19951222	199731 B
WO 9723612	A2	19970703	WO 96EP5768	A	19961220	199732
AU 9713037	A	19970717	AU 9713037	A	19961220	199745
WO 9723612	A3	19970828	WO 96EP5768	A	19961220	199749

Abstract (Basic): DE 19548476 A

Compound of formula (I) is claimed: A-X(1-20)-B(1-20) (I) A = protein, or fragment, of the TGF- beta superfamily with cartilage and/or bone inducing activity; B = 1 or more substituent groups with an affinity to the extracellular matrix, cellular components of bone and/or cartilage and/or to a biocompatible carrier matrix; X = 1 or more covalent bonds and/or spacer groups. Also claimed are: (1) nucleic acid sequence encoding a compound of formula (I) in which B is a peptide; and (2) vector comprising the nucleic acid sequence.

USE- The compound may be used to inhibit bone resorption, prevent or treat bone or cartilage related disorders, including osteoporosis, Paget's disease, osteodystrophy, osteoarthritis or osteoarthropathy and to treat bone or cartilage damage caused by wounding or overloading.



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenl gungsschrift**
⑩ **DE 195 48 476 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁸:
C 07 K 14/51
A 61 L 27/00
A 61 F 2/28
C 12 N 15/12
C 12 N 15/63
C 12 N 1/00
C 12 N 5/10

②1 Aktenzeichen: 195 48 476.2
②2 Anmeldetag: 22. 12. 95
④3 Offenlegungstag: 26. 6. 97

DE 195 48 476 A 1

⑦1 Anmelder:

Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen
Entwicklung von Pharmaka mbH, 69115 Heidelberg,
DE

⑦4 Vertreter:

H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:

Hötten, Gertrud, Dipl.-Biol., 69245 Bammental, DE;
Bechtold, Rolf, Dipl.-Bio.-Chem. Dr., 69126
Heidelberg, DE; Pohl, Jens, Dipl.-Biol. Dr., 76707
Hambrücken, DE; Paulista, Michael, 69181 Leimen,
DE

⑤4 Zielgerichtete Verbindungen mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verbindungen mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität, die eine hohe Affinität zur extrazellulären Matrix und/oder zu zellulären Bestandteilen von Knorpel und/oder Knochen von Wirbeltieren und/oder zu einer biokompatiblen Trägermatrix für Gelenk- oder Knochenimplantate, oder Knochenklebstoffe aufweisen. Die neuen Verbindungen können, abhängig von der Indikation, durch gleichzeitige Hemmung der Knochenresorption in ihrer Wirkung verstärkt werden. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser Verbindungen und diese Verbindungen enthaltende pharmakologische Zusammensetzungen, die zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen die den Knorpel- und/oder Knochen betreffen wie z. B. Osteoporose sowie zur Behandlung und Prävention von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knorpelgewebes verwendet werden können.

DE 195 48 476 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Verbindungen mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität, die eine hohe Affinität zur extrazellulären Matrix und/oder zu zellulären Bestandteilen von Knorpel und/oder Knochen von Wirbeltieren und/oder zu einer biokompatiblen Trägermatrix für Gelenk- oder Knochenimplantate, oder Knochenklebstoffe, aufweisen. Die neuen Verbindungen können, abhängig von der Indikation, durch gleichzeitige Hemmung der Knochenresorption in ihrer Wirkung verstärkt werden. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung dieser Verbindungen und diese Verbindungen enthaltende pharmakologischen Zusammensetzungen, die zur Behandlung und Prävention von Erkrankungen, die den Knorpel- und/oder Knochen betreffen wie z. B. Osteoporose sowie zur Behandlung und Prävention von Schädigungen des Knorpel- und/oder Knorpelgewebes verwendet werden können.

Viele Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Superfamilie sind für einen weiten Bereich medizinischer Behandlungsmethoden und Anwendungen, die insbesondere Wundheilung und Gewebewiederherstellung betreffen, relevant. Für einen Überblick über Mitglieder der TGF- β -Superfamilie vgl. z. B.: Roberts, A.B. & Sporn, M.B. Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990), 419–472; Kingsley, D.M., Genes & Development 8 (1994), 133–146 und die darin zitierte Literatur. Zu den Mitgliedern zählen die TGF- β -Proteine, wie das TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 und TGF- β 5, vgl. z. B.: US-Patent 5,284,763; EP 0376785; US-Patent 4,886,747; Madisen, L. et al, DNA 7 (1988), 1–8; Derynck, R. et al, EMBO J. 7 (1988), 3737–3743; Jakowlew, S.B. et al, Mol. Endo. 2 (1988), 1186–1195; Kondaiah, P. et al, J. Biol. Chem. 265 (1990), 1089–1093. Eine weitere Unterfamilie bilden die Activine/Inhibine mit den bislang bekannten Aktivinketten β A, β B, β C und β D, vgl.: Mason, A.J. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 135 (1986), 957–964; Hötten, G. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 206 (1995), 608–613; Oda, S. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 210 (1995), 581–588. Von β A und β B ist bekannt, daß sie neben dem Homodimer auch ein Heterodimer β A β B bilden können. Bei Kombination mit einer α Untereinheit entstehen die Inhibine, die im wesentlichen entgegengesetzte Aktivitäten in Vergleich zu Activinen aufweisen, vgl.: Vale, W. et al, Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990), 211–248; Vale, W. et al, The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York (1994), 1861–1878. Eine weitere Unterfamilie bilden die Mitglieder der BMP (Bone Morphogenetic Protein)-Familie, wozu die Proteine BMP-2 (BMP-2a), BMP-3, BMP-4 (BMP-2b), BMP-5, BMP-6, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (OP-2), BMP-9, BMP-10, BMP-11 zählen, vgl. z. B. Wozney, J.M. et al, Science 242 (1988), 1528–1534; Celeste, A.J. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 9843–9847; Özkaynak, E. et al, J. Biol. Chem. 267 (1992), 25220–25227; WO 94/00432; 26893; WO 94/26892. Eine weitere Untergruppe ist die GDF (Growth Differentiation Factor)-Familie, zu denen GDF-1, GDF-3, GDF-9 sowie die für die Knorpel- und/oder Knocheninduktion insbesondere interessanten GDF-5, GDF-6 und GDF-7 zählen; vgl.: McPherron, A.C. & Lee, S.-J. Biol. Chem. 268 (1993); 3444–3449; Storm, E.E. et al, Nature 368 (1994), 639–643; Lee, S.-J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 4250–4254. Für die TGF- β Superfamilienmitglieder dpp und 60A aus Drosophila konnte auch ein knorpel- und knocheninduzierendes Potential nachgewiesen werden, vgl.: Sampath, T.K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 6004–6008. Interessant sind auch die Proteine dorsalin und das Bone Formation-Inducing Protein, vgl. Basler, K. et al, Cell 73 (1993), 687–702; WO 94/01557. Beschrieben sind auch Heterodimere von verschiedenen Mitgliedern, vgl. z. B.: Aono, A. et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 210 (1995), 670–677; WO 93/09229; EP 0 626 451. Bekannt ist, daß viele Mitglieder insbesondere aus den Unterfamilien der TGF- β -, BMP- und GDF-Familien ein knorpel- und/oder knocheninduzierendes Potential aufweisen, wobei aber auch Mitglieder der Aktivinfamilie, zumindest in Kombination mit weiteren TGF- β -Superfamilienmitgliedern, Einfluß auf die Knochenbildung nehmen können; vgl. beispielsweise Hock, J.M. et al, Endocrinol. 126 (1990), 421–426; Wang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 2220–2224; Wozney et al, Mol. Reprod. Dev. 32 (1992), 160–167; Sampath et al, J. Biol. Chem. 267 (1992), 20352–20362; Ogawa, Y. et al, J. Biol. Chem. 267 (1992), 14233–14237; WO 88/00205; US-PS 5,013,649; WO 89/10409; WO 90/11366; WO 91/05802; WO 92/15323; WO 91/18098; WO 93/00432; WO 93/09229; WO 03/01557; WO 94/26893; WO 94/26892; WO 94/15949; WO 95/01801; WO 95/01802 und EP 0 626 451.

In WO 93/16099 und WO 95/04819 werden die DNA- und Proteinsequenzen von weiteren TGF- β ähnlichen Proteinen, insbesondere von MP52, beschrieben, die nicht aus Knochen isoliert wurden. Bei MP121 handelt es sich um das bereits beschriebene Activin β C. Insbesondere von Interesse ist MP52, für das u. a. ein knorpel- und knocheninduzierendes Potential nachgewiesen werden konnte. Das humane MP52 hat in seinem reifen Anteil nur eine Aminosäure Unterschied im Vergleich zu dem aus Mäusen isolierten GDF-5.

Die Mitglieder der TGF- β Superfamilie, die ein knorpel- und/oder knocheninduzierendes Potential besitzen, zeichnen sich im reifen Anteil durch hohe Aminosäurehomologien aus und besitzen die TGF- β Superfamilienmitglieder typischen sieben konservierten Cysteine. Mitglieder dieser Superfamilien liegen in ihrer aktiven Form normalerweise alle als homo- und/oder heterodimere Proteine vor. Trotzdem zeigen sie Variationen wie z. B. das Auftreten in unterschiedlichen Gewebestufen und Entwicklungsstufen. Häufig zeigen einzelne dieser Wachstumsfaktoren neben ihrem knorpel- und/oder knocheninduzierenden Potential noch weitere Funktionen, was ihre Anwendung bei verschiedenen medizinischen Indikationen ermöglicht. Gleichzeitig bedeutet dies bei nicht lokaler Anwendung, wie z. B. systemischer Applikation von hohen Dosen, aber auch die Gefahr von Nebenwirkungen.

Chemische Substanzen wie die Diphosphonsäuren bzw. Diphosphonate bzw. Biphosphonate oder deren Salze können sich im Knochen von lebenden Organismen anreichern. Untersuchungen haben gezeigt, daß typische Diphosphonsäuren nach intravenöser Applikation sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt und zu einem hohen Prozentsatz in Knochengewebe angereichert werden; vgl. beispielsweise Lin, J.H. et al (1991) Drug M. tabl. Dispos. 19, 926–932.

Bekannt geworden sind die Diphosphonsäuren vor allem durch ihren Einfluß auf den Knochenstoffwechsel. So kann krankhaft gesteigerter Knochenabbau durch Hemmung der Osteoklastentätigkeit vermindert werden; vgl.

beispielsweise Van Gelder, J.M. et al. (1995) Bone 16, 511–520, und Ott, S.M. (1993) J. Bone Miner. Res. 8 Suppl. 2, S. 597–606. Dies verbessert zwar die negative Bilanz bei Krankheiten im Knochenstoffwechsel wie z. B. der Osteoporose, jedoch konnte für Diphosphonsäuren ein eher inhibierender Einfluß auf menschliche Osteoblasten, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind, gezeigt werden; vgl. Khokher, M.A. & Dandona, P. (1989) Metabolism 38, 184–187.

Hemmung der Knochenresorption kann auch erreicht werden durch Proteine, die eine Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) enthalten. Peptide mit einer RGD-Sequenz binden an Oberflächen-Rezeptoren einiger Zellen und verhindern damit deren Bindung an extrazelluläre Matrix. Proteine mit RGD-Sequenzen, wie z. B. das Echistatin oder Kistrin sind in der Lage, die Adhäsion von Osteoclasten an die Knochenmatrix und damit deren Resorption zu hemmen; vgl. z. B.: van der Pluijm G. et al., J. Bone Miner. Res. 9 (1994), 1021–1028; King, K.L. et al., J. Bone Miner. Res. 9 (1994), 381–387; Horton, M. A. et al., J. Bone Miner. Res. 8 (1993), Endocrinology 132, 1411–1413.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen bereitzustellen, die hohe knorpel- und/oder knocheninduzierende Aktivitäten aufweisen sollen, und die gleichzeitig eine hohe Affinität zur extrazellulären Matrix und/oder zellulären Bestandteilen von Knorpel und/oder Knochen von Wirbeltieren und/oder zu einer biokompatiblen Trägermatrix zeigen sollen. Dadurch sollen die Verbindungen insbesondere im Knochengewebe mit dem Ziel einer gesteigerten Knochensynthese angereichert werden, um die Behandlung oder Prävention von Erkrankungen, die den Knorpel- und/oder Knochen betreffen und die insbesondere mit einem Verlust an Knochensubstanz einhergehen oder Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes sowie die Fixierung bzw. Stabilisierung von Implantaten zu verbessern. Ferner sollen neue Verbindungen bereitgestellt werden, die neben einer knorpel- und/oder knocheninduzierenden Aktivitäten gleichzeitig eine Verringerung des Knochenabbaus durch Hemmung der Osteoklasten bewirken.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst. Insbesondere wird eine Verbindung bereitgestellt, die folgende allgemeine Formel umfaßt:



wobei A ein Protein der TGF- β -Superfamilie mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität oder ein Fragment davon bedeutet, B ein oder mehrere gleiche oder verschiedene Anhanggruppen mit $n=1-20$ und mit einer Affinität zur extrazellulären Matrix und/oder zellulären Bestandteilen des Knorpels und/oder Knochens und/oder zu einer biokompatiblen Trägermatrix bedeutet. B kann, abhängig von der Indikation, gleichzeitig die Knochenresorption hemmen. X bedeutet eine oder mehrere kovalente Bindungen oder einen oder mehrere Abstandshalter mit $m=1-20$, die gleich oder unterschiedlich sein können. X bleibt im Körper vorzugsweise stabil, kann für einige Anwendungen aber auch, vorzugsweise am Wirkort, beispielsweise hydrolytisch abgespalten werden, so daß A und B freigesetzt werden. n kann gleich oder verschieden von m sein.

Der Begriff "Protein der TGF- β -Superfamilie mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität" bedeutet ein Protein, das im reifen Anteil die charakteristischen konservierten 7 Cysteine enthält. Dazu zählen Mitglieder der TGF- β -, der Acitivin-, der BMP- und der GDF-Familie und insbesondere MP52 sowie Fragmente davon mit grundsätzlich derselben Aktivität. Umfaßt sind bevorzugt Homodimere der genannten Proteine, aber auch Heterodimere aus verschiedenen Familienmitgliedern. Bevorzugt umfaßt sind Proteine, die denselben Rezeptormechanismus und/oder dieselbe Signalübertragung wie die Mitglieder der BMP- und/oder GDF-Familie, insbesondere von MP52 besitzen. Das knorpel- und/oder knocheninduzierende Potential kann in erkannten Versuchen wie z. B. in vivo durch Induktion von Knorpel- und/oder Knochen nach Implantation des Proteins mit einer geeigneten Trägermatrix in die Rattenmuskulatur; vgl. z. B. Sampath, T.K. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 20352–20362 und/oder in vitro durch Induktion von Alkalischer Phosphatase Aktivität auf ROB-C26 Zellen; vgl. Yamaguchi, A. et al., J. Cell Biol. 113 (1991), 681–687 und/oder W-20-17 Zellen; vgl. Thies, R.S. et al. Endocrinol. 130 (1992), 1318–1324 und/oder Stimulation der Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix, vgl.: Hock, J.M. et al. Endocrinol. 126 (1990), 421–426 und/oder in Versuchen wie sie bei Chen, P. et al., Exp. Cell Res. 195 (1991), 509–515 und/oder Vukicevic, S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 8793–8797 beschrieben sind, überprüft werden. Das Protein kann als reifes Protein, aber auch als Vorläufer-Protein oder Protein mit verschiedenen Prozessierungen im Propeptidanteil und/oder mit N- und/oder C-terminalen Aminosäuresequenzen, welche die biologische Aktivität im wesentlichen nicht beeinflussen, vorliegen. Das Protein kann substituierte oder eingefügte Aminosäuren enthalten oder deletiert sein, ebenfalls unter der Voraussetzung, daß die Aktivität nicht wesentlich beeinflußt wird, und aus verschiedenen Spezies, wie z. B. Mensch, Maus, Ratte, Rind oder Schwein isoliert sein. Ferner kann das Protein durch im Stand der Technik bekannte Methoden, beispielsweise Glycosylierungen, Phosphatierungen, Sulfatierungen und Veresterung mit Fetten modifiziert sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist A ein Protein aus der GDF- oder BMP-Familie oder ein Fragment davon.

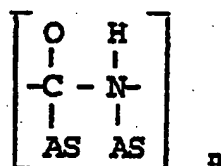
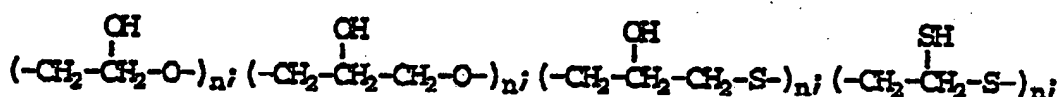
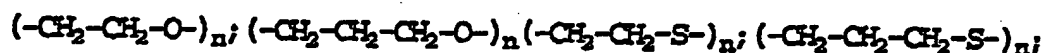
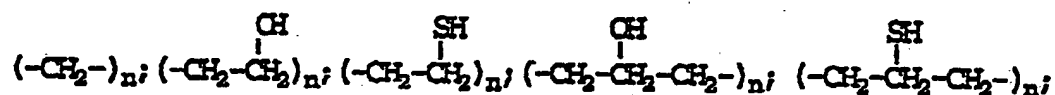
In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt das Protein A das MP52-Protein mit der in Fig. 1 gezeigten Primärsequenz oder ein Fragment davon. Insbesondere umfaßt diese Ausführungsform das reife MP52 oder funktionelle Anteile bzw. Fragmente davon, wobei die aktive Form vorzugsweise als Dimer vorliegt. Besonders bevorzugt sind funktionelle Teilbereiche bzw. Abschnitte bzw. Fragmente, die mindestens den Bereich der sieben konservierten Cysteine enthalten.

Der Begriff "Fragment" bedeutet einen Teil des Proteins A, der im wesentlichen auch die knorpel- und/oder knocheninduzierende Aktivität aufweist.

Der Begriff "Abstandshalter" bedeutet eine Verbindung von mindestens zwei reaktiven bzw. funktionellen, zur Bindung an A und B befähigten Gruppen, wobei diese Gruppen gleich oder unterschiedlich sein können. Bevorzugt sind Verbindungen mit unterschiedlichen reaktiven Gruppen. Die reaktiven Gruppen können inner-

halb oder an den Enden des Abstandshalters X lokalisiert sein. Die reaktive Gruppe kann eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe, eine Hydroxylgruppe oder eine Sulfhydrylgruppe sein.

Der Abstandshalter kann z. B. ein Oligopeptid sein. Der Abstandshalter kann ein substituierte oder unsubstituierte Kette mit vorzugsweise 1–100 Atomen bzw. Kettenatomen, insbesondere Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- und/oder Schwefel-Atome sein. Der Abstandshalter umfaßt auch mehrere derartige Ketten, die über Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Stickstoff- und/oder Schwefel-Atome verbrückt sind. Die Substituenten können z. B. Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Alkyl-, und/oder cyclische oder heterocyclische Gruppen wie z. B. Kohlenhydrate sein. Beispiele, die aber nicht begrenzend sein sollen, sind nachfolgend ausgeführt, wobei n 1–50 und AS eine beliebige Aminosäure bedeutet:



Vorzugsweise verleiht der Abstandshalter der erfindungsgemäßen Verbindung eine hydrophile Eigenschaft.

Der Begriff "Anhanggruppe" bedeutet in einer ersten erfindungsgemäßen Ausführungsform ein Peptid mit einer insbesondere unter physiologischen Bedingungen ausreichenden Affinität für spezifische Bestandteile der extrazellulären Matrix und/oder zellulärer Bestandteile von Knorpel oder Knochen und/oder einer biokompatiblen Trägermatrix, um daran gebunden zu werden. Davon umfaßt sind auch Peptide, die eine RGD-Sequenz enthalten. Der Begriff umfaßt weiterhin polyklonale oder monoklonale Antikörper oder spezifische Fragmente davon. Die Seitenketten des Peptids können durch im Stand der Technik bekannte Methoden, wie vorstehend aufgeführt, modifiziert sein. Insbesondere können Zuckerreste über N- und O-glykosidische Bindungen zur Hydrophilisierung des Peptids eingeführt werden.

Der Begriff "extrazelluläre Matrix" umfaßt Bestandteile von Knorpeln und Knochen außerhalb von Zellen, insbesondere die verschiedenen Kollagentypen z. B. Kollagen I, II, V, IX, X, XI und XIII, weiterhin Hydroxylapatit, Proteoglycane und Glycosaminoglykane wie beispielsweise Chondroitinsulfat, Biglykan, Decorin und/oder Hyaluronsäure, weiterhin Proteine wie z. B. Osteopontin, Sialoprotein, Osteonectin, Osteocalcin, Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin, CMP (Cartilage Matrix Protein) und Dentin Phosphoprotein.

Der Begriff "zelluläre Bestandteile im Knorpel und/oder Knochen" betrifft lebende Zellen im Knorpel und/oder Knochen wie beispielsweise Chondroblasten, Chondrocyten, Chondroklasten, Osteoblasten, Osteocyten, Osteoklasten und Odontoblasten.

Der Begriff "biokompatible Trägermatrix" umfaßt insbesondere Gelenk- oder Knochenimplantate. Matrices können aus Materialien bestehen, die bereits für Implantationen in der Allgemein- und Zahnmedizin eingesetzt werden. Bestandteile von Trägermatrices sind z. B. Hydroxylapatit, Calciumsulfat, Calciumcarbonat, Tricalciumphosphate, Poly-Milchsäuren bzw. deren Derivate (z. B. Poly [D,L-(lactide-co-glycolide)]) und/oder Bestandteile der extrazellulären Matrix. Dazu zählen auch verschiedene Kollagentypen, wie sie z. B. aus Knochen und/oder aus der Haut isoliert werden können. Umfaßt ist auch von Korallen gebildetes Material wie z. B. Biocoral (erhältlich von Innoteb, Frankreich). Als Trägermatrices verwendbar sind auch keramische und/oder metallisch und/oder glashaltige Werkstoffe, wie z. B. gesintertes Hydroxylapatit oder Titan. Di Trägermatrices können auch aus Kunststoffen bestehen, darunter sind auch Knochenklebstoffe wie Polymethylacrylate umfaßt. Di Trägermatrices können sich aus mehreren Bestandteilen zusammensetzen, so z. B. Hydroxylapatit kombi-

niert mit Kollagen (z. B. Healos, erhältlich von Orquest Inc., CA, USA). Die erfindungsgemäße Verbindung muß eine Affinität zu einen oder mehreren Bestandteilen der Trägermatrix haben. Die erfindungsgemäße Verbindung kann dabei in der gesamten Trägermatrix verteilt sein oder lokal auf eine Oberfläche appliziert werden, wie z. B. bei der Verankerung von Prothesen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Anhanggruppe B ein Peptid und mit seinem C-Terminus über eine Amidbindung, vorzugsweise eine Peptidbindung, am N-Terminus von A gebunden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Anhanggruppe B ein Peptid und der Abstandshalter X ist ein Oligopeptid, wobei das Peptid mit seinem C-Terminus über eine Amidbindung, vorzugsweise eine Peptidbindung, am N-Terminus des Oligopeptids gebunden ist und das Oligopeptid mit seinem C-Terminus über eine Amidbindung, vorzugsweise eine Peptidbindung, am N-Terminus von A gebunden ist.

Die erfindungsgemäße Verbindung, die eine Anhanggruppe gemäß der ersten Ausführungsform enthält, kann am N- und/oder C-Terminus flankierende Aminosäuresequenzen, wie Signalpeptide, Propeptide oder Fragmente davon umfassen, welche beispielsweise die erfindungsgemäße Verbindung durch enzymatische Abspaltung des Propeptids oder Fragmenten davon in ihre biologisch aktive bzw. native bzw. reife Form überführt.

Das Peptid als Anhanggruppe B gemäß erster Ausführungsform oder das Oligopeptid als Abstandshalter X wird vorzugsweise am N-Terminus des Proteins A gekoppelt. Es ist bereits bekannt, daß Unterschiede oder Modifikationen an den reifen Proteinen wie z. B. unterschiedliche N-Termini die Aktivität der reifen Proteine nicht wesentlich verändern. Genannt sei in diesem Zusammenhang das Protein HisMP52, das trotz zusätzlicher Aminosäuren am N-Terminus aktiv ist, vgl.: Krieglstein K. et al., Neuroscience Res. 42 (1995), 724—732. Bei der praktischen Durchführung kann die DNA, die für das Peptid und/oder das Oligopeptid kodiert, der DNA, die für das Protein kodiert, vorangestellt werden. Dies kann mit den Standardmethoden der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und den rekombinanten Klonierungstechniken durchgeführt werden. Wichtig dabei ist, daß der Leserahmen eingehalten wird. Die Expression und Reinigung der so erhaltenen Fusionsproteine erfolgt nach im Stand der Technik bekannten Methoden.

Bei diesem Herstellungsverfahren ist es vorteilhaft, daß das Peptid und/oder das Oligopeptid definiert am N-Terminus des Proteins hängen. Ankoppeln größerer Anhanggruppen wie Peptide an die Oberfläche, d. h. bestimmte Seitenketten der Proteine können unter Umständen deren Bindeverhalten an Rezeptoren und/oder deren Aktivität stark beeinflussen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um Peptide, die eine Affinität zu knorpel- und/oder knochenspezifischen Strukturen besitzen, zu erhalten. Bei solchen knorpel- und/oder knochenspezifischen Strukturen kann es sich z. B. um Proteine wie verschiedene Kollagen-Typen, Osteopontin oder Osteonectin handeln. Man kann diese spezifischen Strukturen nun als Antigen zur Generierung von monoklonalen Antikörpern einsetzen. Sobald eine Hybridomzelllinie, die den gewünschten monoklonalen Antikörper mit einer einzigen Spezifität gegen das Antigen exprimiert, isoliert ist, können aus dieser die RNA isoliert werden. Nach Umschreiben der RNA in eine cDNA, wird diese in eine PCR eingesetzt, die die Amplifikation der variablen, antigenbindenden Regionen des Antikörpers erlaubt. Die so isolierte DNA kann durch künstlich an den Enden der PCR-Fragmente eingeführten Restriktionsschnittstellen vor die DNA, die für den entsprechenden knorpel- und/oder knocheninduzierenden Faktor kodiert, kloniert werden. Dabei muß die Beibehaltung des Leser Rahmens der antigenbindenden Domäne und des Proteins beachtet werden. Alternativ zu monoklonalen Antikörpern ist es auch möglich, Phagen-Antikörper zu generieren. Ein solches System (Recombinant Phage Antibody System) ist im Handel, beispielsweise bei Pharmacia, erhältlich.

Die Selektion von Peptiden mit den gewünschten Bindungsaffinitäten kann vorzugsweise mit Peptid-Banken erfolgen, die im Handel, beispielsweise bei MoBiTec, erhältlich sind. Bei solchen Systemen werden randomisierte Peptide an den N-Terminus eines filamentösen Phagenproteins (z. B. pIII Genprodukt) fusioniert. Die randomisierten Peptide haben typischerweise eine Größe von 6,8 oder 15 Aminosäuren. Zur Erzielung von hohen spezifischen Affinität oder Erkennung von Sekundärstrukturen kann es aber von Vorteil sein, randomisierte Peptide bis zu einer Länge von 90 Aminosäuren einzusetzen. Das Fusionsprotein wird an der Oberfläche gut zugänglich für mögliche Bindungspartner präsentiert. Durch mehrmalige Affinitätsreinigung und Amplifikation lassen sich Phagen anreichern, die Peptide mit einer Affinität zu den immobilisierten knorpel- und/oder knochenspezifischen Bestandteilen und/oder biokompatiblen Trägermatrixbestandteilen aufweisen. Die DNA einzelner Phagen kann isoliert werden und der Bereich, der für das randomisierte Peptid kodiert, sequenziert werden. Diese DNA kann dann wiederum unter Beibehaltung des Leser Rahmens stromaufwärts von der DNA, die für das knorpel- und knocheninduzierende Protein kodiert, kloniert werden. Dies kann je nach Größe des Peptides über eine Oligonukleotidsynthese des Strangs und Gegenstrangs mit eventuell zusätzlichen Restriktionsschnittstellen an den Enden oder über im Stand der Technik bekannte PCR-Techniken erfolgen.

Von einigen Bestandteilen der extrazellulären Matrix und/oder der biokompatiblen Trägermatrix wie z. B. dem Hydroxylapatit ist bereits einiges bekannt über die Art der Wechselwirkung mit Proteinen; vgl. M.P. Deutscher, Guide to Protein Purification, Methods in Enzymology 182, Academic Press, INC. S. 329 f.) Aufgrund solcher Daten lassen sich Peptide erstellen, die voraussichtlich eine hohe Affinität zu z. B. Hydroxylapatit aufweisen.

Bekannt sind außerdem bereits Wechselwirkungen von zellulären Bestandteilen mit Peptiden. So verfügen z. B. die Osteoklasten über Rezeptoren, die Peptide mit RGD Sequenzen binden, wodurch die osteoklastische Resorption von Knochenmatrix inhibiert wird. Solche Peptide sind z. B. das Echistatin, Kistrin, GRGDSPK oder GRGDSP; vgl. von der Pluijm G. et al., J. Bone Miner. Res. 9 (1994), 1021—1028; King, K.L. et al., J. Bone Miner. Res. 9 (1994), 381—387; Horton, M.A. et al., J. Bone Miner. Res. 8 (1993), 239—247; Gronowicz, G.A. & Derome, M.E., J. Bone Miner. Res. 9 (1994), 193—201. Diese Peptide können direkt oder über einen Abstandshalter an den

N-Terminus eines knorpel- und/oder knocheninduzierenden Proteines der TGF- β -Superfamilie g hängt werden.

Ein Peptid als Anhanggruppe B ist insbesondere dann von Interesse, wenn die knorpel- und/oder knocheninduzierenden Faktoren lokal auf einer biokompatiblen Trägermatrix verwendet werden. So haben Trägermaterialien häufig Kollagen oder Hydroxylapatit als Bestandteil. Somit kann durch Anhängen eines Peptides mit Affinität zu Kollagen und/oder Hydroxylapatit erreicht werden, daß die erfindungsgemäße Verbindung bevorzugt auf dem Trägermaterial verbleibt, nicht weit diffundiert und damit die Verbindung am Wirkort fixiert. Dies kann besonders bei wenig porösen Trägermaterialien von Vorteil sein. Ein Beispiel für die Anwendung wäre die bessere Fixierung einer Prothese im Knochengerüst. Dafür wird die Prothese an der Übergangsstelle zum Knochen zunächst mit Hydroxylapatit und nachfolgend mit der erfindungsgemäßen Verbindung, dessen Anhanggruppe eine Affinität zu Hydroxylapatit aufweist, oder gleichzeitig mit beiden beschichtet.

Ein Peptid als Anhanggruppe B ist auch von besonderem Interesse bei Knochentransplantationen und Zahnimplantaten, wobei die Oberfläche von Knochen und/oder Zähnen mit der erfindungsgemäßen Verbindung bestrichen werden kann, um die lokale Fixierung der natürlichen oder auch künstlichen Implantate zu beschleunigen und zu verbessern. Die beiden zu verbindenden Knochenteile können vor der Applikation der erfindungsgemäßen Verbindung aufgeraut werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die mindestens eine für die erfindungsgemäße Verbindung, die eine Anhanggruppe gemäß der ersten Ausführungsform enthält, kodierende Nukleinsäuresequenz umfaßt, wobei die Nukleinsäuresequenz entsprechend dem genetischen Code degeneriert sein kann. Die erfindungsgemäße Verbindung kann durch posttranslationale Reaktionen in vivo oder durch im Stand der Technik bekannte chemische und/oder enzymatische Methoden in vitro modifiziert sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfaßt die Nukleinsäure die in Fig. 2 gezeigte DNA-Sequenz.

Die Begriffe "Nukleinsäure" oder "Nukleinsäuresequenz" bedeuten natürliche oder halbsynthetische oder synthetische oder modifizierte Nukleinsäuremoleküle aus Desoxyribonukleotiden und/oder Ribonukleotiden und/oder modifizierten Nukleotiden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der die vorstehend definierte, erfindungsgemäße Nukleinsäure zur Expression der erfindungsgemäßen Verbindung in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen enthält. Der erfindungsgemäße Vektor kann vorzugsweise geeignete regulatorische Elemente, wie Promotoren, Enhancer, Terminationssequenzen enthalten. Der erfindungsgemäße Vektor kann beispielsweise ein Expressionsvektor oder ein Vektor zur vorzugsweise stabilen Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das genetische Material einer Wirtszelle sein. Ein geeignetes Expressionssystem ist beispielsweise das Bakulovirus-System, das E. coli-Expressionssystem bzw. Expressionsvektoren für Säugerzellen wie z. B. auf Vaccinia-, Adeno-, SV40- oder auf Retroviren basierenden Vektoren.

Es ist leicht feststellbar, welcher minimale Nukleinsäure-Anteil erforderlich ist, um ein exprimiertes Protein zu erhalten, das knorpel- und/oder knocheninduzierende Aktivität besitzt. Ein geeignetes in vitro Testsystem ist z. B. in Yamaguchi et al. J. Cell Biol. 113 (1991), 681–687 und/oder in Hock, J.M. et al. Endocrinol. 126 (1990), 421–426, und ein geeignetes in vivo Testsystem z. B. in Sampath, T.K. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 20352–20362, beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder den erfindungsgemäßen Vektor enthält. Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise Prokaryonten, wie E. coli oder Bacillus, ein Pilz wie Hefe, oder eukaryotische Wirtszellen wie Pflanzenzellen, beispielsweise Tabak oder Arabidopsis, Säugerzellen, beispielsweise HuTK-, NIH3T3-, L-, Mo-, COS-, Hela-, CHO-Zelllinien, oder Insektenzellen, beispielsweise Spodoptera frugiperda (SF9) oder Trichoplusia ni (TN368). Unter Ausnutzung von Insektenviren können Mitglieder der TGF- β -Superfamilie auch in Insektenlarven zur Expression gebracht werden; vgl. beispielsweise Ishida et al. (1994) J. Biochem. 115, 279–285. Für eine ausreichende Expressionsrate ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure entweder im genetischen Material der Wirtszelle stabil integriert oder der erfindungsgemäße Vektor enthält geeignete regulatorische Bereiche zur Replikation, Transkription und/oder Translation in vivo und/oder in vitro, d. h. auch im zellfreien System.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung, die eine Anhanggruppe gemäß der ersten Ausführungsform enthält, umfassend die Schritte:

- (a) Transformation bzw. Transfektion geeigneter Wirtszellen mit der vorstehend definierten Nukleinsäure oder dem vorstehend definierten Vektor,
- (b) Züchten der transformierten Wirtszellen unter für die Expression der Verbindung geeigneten Bedingungen in einem Kulturmedium, und
- (c) Isolierung der Verbindung aus den Wirtszellen oder dem Kulturmedium.

Die Reinigung von exprimierten Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie erfolgt nach herkömmlichen Methoden. Bei der Herstellung in Bakterien können die Proteine in Form von Einschlusskörpern ("inclusion bodies") vorliegen, wie es z. B. bei MP52 der Fall ist. Diese Einschlusskörper werden nach an sich bekannten Methoden renaturiert, um das Protein, beispielsweise MP52, in einer aktiven Form zu erhalten. In E. coli exprimiertes MP52 kann zu einem aktiven Protein zurückgefaltet werden, vgl.: Kriegstein K. et al., J. Neuroscience Res. 42 (1995), 724–732. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß z. B. BMP-2 ebenfalls in E. coli exprimiert und zum Dimer gefaltet werden kann.

Der Begriff "Anhanggruppe" bedeutet in einer zweiten erfindungsgemäßen Ausführungsform eine Diphosphonsäure, die mindestens eine zur Kopplung an A oder X befähigte, vorzugsweise endständige Gruppe enthält oder ein Salz davon ist. Insbesondere hat die Anhanggruppe B die folgende Formel:

R-(PO₃H₂)₂

worin der Rest R beispielsweise aus Gruppen besteht, wie sie in den Patenten WO 9506052 A, WO 9324499 A, WO 9324497 A, WO 9211269 A, WO 9211267 A, WO 9203451 A, WO 9110646 A, WO 9015806 A, WO 9012017 A, WO 8909775 A, WO 8703598 A, US 5412141 A, US 5338731 A, US 5196409 A, US 5039819 A, JP 05339280 A, JP 05032684 A, JP 63295595 A, JP 63066190 A, EP 600834 A, EP 600371 A, EP 620227 A, EP 576396 A, EP 548884 A, EP 521622 A, EP 498424 A, EP 491374 A, EP 464509 A, DE 42 44 422 A, DE 39 17 153 A, DE 37 19 513 A, DE 35 40 150 A, EP 416689 A, EP 354806 A, EP 304962 A, EP 304961 A, EP 252504 A, EP 282320 A, EP 207557 A, EP 197478 A, EP 189662 A, EP 170228 A, AU 8551534 A, und EP 546548 A beschrieben werden, und auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Umfaßt sind auch Diphosphonsäuren wie z. B. Alendronsäure, Clodronsäure, Pamidronsäure, Etidronsäure, Neridronsäure, Risedronsäure, Tiludronsäure, Mildronsäure, Aminohydroxy-Propylen-Diphosphonsäure, YM 175 oder BM-210995 und deren Salze. Insbesondere sind auch Guanidinoalkyl-1,1-diphosphonsäuren und heterocyclische Iminobismethylen-Diphosphonsäuren und deren Derivate und Salze umfaßt; vgl.: EP 600371 A; EP 620227 A; EP 546548 A.

Insbesondere besteht der Rest R aus R₁ - C - R₂, wobei R₁ eine Hydroxylgruppe, Aminogruppe, Halogengruppe, Carboxylgruppe, Sulfhydrylgruppe, Guanidiniumgruppe oder ein Wasserstoffatom bedeutet und R₂ einen unsubstituierten oder durch C₁-20-Alkyl- und/oder Arylreste und/oder Kohlenhydratreste substituierten, linearen, verzweigten, cyclischen oder heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten C₁-20-Kohlenwasserstoffrest bedeutet, der mindestens eine zur Kopplung an A oder X befähigte, vorzugsweise endständige Gruppe enthält, oder ein Salz davon.

Spezifische Beispiele der Anhanggruppe gemäß zweiter Ausführungsform sind Derivate der 1-Hydroxy-1,1-diphosphonsäuren; vgl. z. B.: EP 0 494 844, WO 9400462 A, DE 42 44 423 A, DE 40 11 777 A, und GB-A-2 248 061.

In allen Fällen gilt, daß die Diphosphonsäure mindestens eine zur Kopplung an A oder X befähigte, vorzugsweise endständige reaktive Gruppe enthält oder ein Salz davon ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die zur Kopplung an A oder X befähigte Gruppe eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe, eine Sulfhydrylgruppe, eine Hydroxylgruppe oder ein Kohlenhydratrest.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Verbindung, die eine Anhanggruppe gemäß zweiter Ausführungsform enthält, wobei entweder (i) die Anhanggruppe B chemisch an A gekoppelt wird oder (ii) die Anhanggruppe B chemisch an den Abstandshalter X gekoppelt wird und/oder der Abstandshalter X chemisch an A gekoppelt wird.

Zur Herstellung der Anhanggruppe B können im Stand der Technik bekannte Verfahren verwendet werden; vgl. z. B. EP 0 494 844 und GB 2 248 061. Ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Herstellung dieser Anhanggruppe ist die nachfolgende Verknüpfung der Bestandteile A und B oder X und B der erfindungsgemäßen Verbindung.

Die Kopplung eines Proteins an eine chemische Substanz kann unter Ausnutzung verschiedener chemischer Reaktionen erfolgen; vgl. beispielsweise Glazer, A.N., DeLange, R.J., Sigman, D.S. (Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Chemical modifications of proteins, Elsevier Biomedical press, 1975), S.S. Wong (Chemistry of protein conjugation and crosslinking, CRC Press, 1991) und Means and Feeney (Chemical modifications of proteins, history and applications, Bioconjugate Chem. 1, 1990). Von besonderem Interesse ist die Kopplung der Anhanggruppe oder des Abstandshalters über eine Amidbindung an das Protein der erfindungsgemäßen Verbindung. Dafür ist es notwendig, daß die Anhanggruppe oder der Abstandshalter eine Amino- oder eine Carboxylgruppe enthält. Die Bildung einer stabilen kovalenten Amidbindung kann über bestimmte Kopplungsreagenzien wie z. B. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid, N-Hydroxysuccinimide oder Sulfo-N-Hydroxy-succinimide vermittelt werden; vgl. beispielsweise Sheehan, J.C. and Ledis, S.L. (1973) J. Am. Soc. 95, 875.

Viele BMP-Mitglieder und auch das MP52-Protein verfügen über eine Anhäufung von basischen Aminosäuren (Lysin und Arginin) in der Nähe des N-Terminus. Sowohl die freien Aminogruppen der Lysinreste als auch der N-Terminus selbst können für eine Kopplung der Anhanggruppe oder des Abstandshalters genutzt werden. Auf der Oberfläche der Proteine gibt es in Abhängigkeit von der Art des TGF- β -Superfamilienmitgliedes aber noch zusätzliche Aminogruppen von Lysinen, die für eine Kopplung frei zugänglich sind. Trotzdem kann es von Vorteil sein, eine Anhanggruppe mit einer zusätzlichen Carboxylgruppe als reaktive Gruppe zu verwenden, um eine vorzugsweise Kopplung der Anhanggruppe über eine Amidbindung an bzw. in der Nähe des N-Terminus zu bewirken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung und Verwendung einer Verbindung bei der zwei oder mehr Anhanggruppen, die verschieden sein können, enthalten sind. Ein Beispiel ist eine Verbindung mit einem Peptid, das die RGD Sequenz am N-Terminus des knorpel- und/oder knocheninduzierenden Proteins der TGF- β -Superfamilie und zusätzlich mehreren Diphosphonsäuren enthält. Ein weiteres Beispiel wäre eine Verbindung bestehend aus einem Peptid mit Affinität zu Hydroxylapatit am N-Terminus des knorpel- und/oder knocheninduzierenden Proteins der TGF- β -Superfamilie und zusätzlich mehreren Diphosphonsäuren. Die Anhanggruppen können dabei über eine kovalente Bindung und/oder einen Abstandshalter mit dem Protein der TGF- β -Superfamilie verbunden sein. Mit derartigen Verbindungen lassen sich Affinitäten zu Knorpel- und/oder Knochenbestandteilen und/oder biokompatiblen Trägermatrix zusätzlich verstärken und in Abhängigkeit von der Indikation mit einer Reduktion der Knochenresorption kombinieren.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auf ihre Wirksamkeit in gängigen Testsystemen wie z. B. dem Tiermodell der ovariektomierten Ratte getestet werden; vgl.: Wronski et al., Calcif. Tissue Int. 37 (1985), 324-328; Durbridge et al. Calcif. Tissue Int. 47 (1990), 383-387.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung in einer pharmazeutisch wirksamen Konzentration und gegebenen-

falls pharmazeutisch verträgliche Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- und/oder Füllstoff enthält.

Die erfindungsgemäßen Verbindung kann zur Vorbeugung oder systemischen oder lokalen Behandlung von Erkrankungen, die den Knorpel- und/oder Knochen betreffen, beispielsweise Osteoporose, Paget'sche Krankheit, Osteodystrophia, Osteoarthritis oder Osteoarthropathie und von Schädigungen des Knorpel- oder Knochengewebes verursacht durch Verletzung oder Überbelastung, bei Wirbeltieren, insbesondere Säugern wie Menschen, verwendet werden.

Zur Behandlung von Knorpel- und/oder Knochenerkrankungen oder Defekten kann die erfindungsgemäße Verbindung bei systemischer Applikation injiziert, z. B. subcutan, venös oder intramuskulär, nicht-oral, oral oder durch jegliche andere pharmazeutisch übliche Methoden bereitgestellt werden. Bei lokaler Applikation ist die Bindung an eine vorstehend definierte Trägermatrix und/oder Applikation direkt auf dem Knochen oder Knorpel möglich. Die Dosis liegt je nach Art der Proteinkomponente und der Anhanggruppe in Abhängigkeit von der Applikationsart, dem Krankheitsbild und dem Zustand des Patienten im Bereich von 0,1 bis 1000 µg/kg Körpergewicht.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des Verläuferproteins des humanen TGF-β-Proteins MP52. Der Beginn des reifen Proteins liegt vorzugsweise im Bereich der Aminosäuren 361-400, besonders bevorzugt bei Aminosäure 381 oder 382. Der reife Proteinanteil enthält die sieben konservierten Cysteine an den Positionen 400, 429, 433, 465, 466, 498 und 500.

Fig. 2 zeigt die für das in Fig. 1 gezeigte Protein kodierende Nukleinsäuresequenz. Das ATG-Startcodon für das Vorläuferprotein beginnt mit Nukleotid 640. Das reife Protein beginnt bevorzugt mit Nukleotid 1780 oder Nukleotid 1783. Das Stoppcodon beginnt mit Nukleotid 2143.

Mit den erfindungsgemäßen Verbindungen können Erkrankungen, die mit einem Knochenverlust einhergehen, wie er z. B. bedingt ist durch Alter, Stoffwechselerkrankungen oder entzündliche Prozesse, gezielt behandelt werden. Ein Beispiel ist die Osteoporose, bei der eine unzureichende Neubildung von Knochensubstanz erfolgt. Erkrankungen wie Osteodystrophia fibrosa generalisata, die mit einem regellosem Knochenabbau einhergeht oder die Paget'sche Krankheit, die mit der Auflösung der normalen Knochensubstanz verbunden ist oder auch Osteoarthritis oder Osteoarthropathie können mit den erfindungsgemäßen Verbindungen behandelt werden. Geeignet sind die erfindungsgemäßen Verbindungen auch als vorbeugende Maßnahmen. Gezielte lokale Behandlungen sind auch bei Schädigungen des Knorpel- und/oder Knochengewebes wie z. B. Knochenfrakturen oder Sportverletzungen insbesondere nach Überbelastung des Bewegungsapparates oder nach Unfällen möglich. Die erfindungsgemäßen Verbindungen ermöglichen auch die Fixierung zweier beweglicher Knochenanteile durch deren Verbindung wie z. B. die Verbindung zweier Rückenwirbel über eine neu gebildete Knochenbrücke, wie es z. B. bei Bandscheibenproblemen von Vorteil sein kann. Vorteile bietet die Verbindung auch bei großen Trägermatrices wie sie z. B. bei der künstlichen Verlängerung von Gliedmaßen oder in der plastischen Chirurgie benötigt werden. Vorteilhaft sind die erfindungsgemäßen Verbindungen auch in der Zahnmedizin bei z. B. Kieferbehandlung und Parodontose.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Verbindungen ist die Möglichkeit, lokal applizierte, knorpel- und knocheninduzierende Faktoren an ihrem Zielort gezielt zu fixieren und eine Diffusion in benachbartes Gewebe zu vermindern. Dies hat vorteilhafterweise eine deutliche Reduzierung der erforderlichen Dosen zur Folge. Ferner kann eine Freisetzung der erfindungsgemäßen Verbindung aus einem implantierten vorstehend definierten Trägermatrix verlangsamt oder verhindert werden.

Mit dem dieser Erfindung zugrundeliegenden synergistischen Effekt durch Kombination von zwei Wirkungsmechanismen in einer Verbindung, d. h. pharmazeutische Wirkung und deutlich erhöhte Affinität zum Wirkort, können deutlich bessere Ergebnisse bei Behandlungen erreicht werden. Zusätzlich ist nun gemäß der vorliegenden Erfindung möglich, daß ein knocheninduzierender Faktor, der eine Aktivierung der Osteoblasten (Zellen, die verantwortlich für den Knochenaufbau sind) verursacht, gleichzeitig mit einem Faktor, der die Hemmung von Osteoklasten (Zellen, die verantwortlich für den Knochenabbau sind) bewirkt, eingesetzt werden kann. Dies hat eine Erzeugung neuer Knochenmatrix zur Folge, was die negative Bilanz bei Krankheiten des Knochenstoffwechsels deutlich in einen positiven Bereich überführen kann. So können Krankheiten, die den Knochenstoffwechsel, insbesondere den Verlust an Knochensubstanz betreffen, wie z. B. die Osteoporose wesentlich wirkungsvoller behandelt werden.

Patentansprüche

1. Verbindung, umfassend folgende allgemeine Formel:



wobei A ein Protein der TGF-β-Superfamilie mit knorpel- und/oder knocheninduzierender Aktivität oder ein Fragment davon bedeutet, B eine oder mehrere gleiche oder verschiedene Anhanggruppen mit einer Affinität zur extrazellulären Matrix und/oder zellulären Bestandteilen des Knorpels und/oder Knochens und/oder zu einer biokompatiblen Trägermatrix bedeutet, X eine oder mehrere kovalente Bindungen und/oder einen oder mehrere gleiche oder verschiedene Abstandhalter bedeutet, n eine ganze Zahl von 1-20 bedeutet und m eine ganze Zahl von 1-20 bedeutet.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei A ein Protein aus der GDF- oder BMP-Familie oder ein Fragment davon ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei A ein Protein mit folgender Primärsequenz

MRLEKLLIIFL IWYLAWLDE FICTVLGAPD LGQRPOGIRP GLAKAEAKER
 PPLARNVFRP GGHSYGGGAT NANARAKGGT GQIGGLITQPK KDEPKKLPER
 PGGPEPKFGH PPQIRQATAR TVTPKGQLFG GKAPPKAGSV PSSFLKKAR
 EPGPFREPKTE PFRPPPTITH EYMLSLYRIL SDADRKGGS SVKLEAGLAN
 TTTSFIDKGQ DDRGFWVRKQ RYVFDISALE KDGLIGAEIR ILRKKEPOTA
 KPAAPGGGRA AQLKLESSCPG GRQPASLIDV RSVPGLDGSG WEVFDIWKLF
 RNEKNSAQLC LELEAWERGR AVDLRGLGFD RAARQVHEKA LFLVFGRIKK
 RDLFFNEIKA RSGQDDKIVY EYLFSSORRRK RAPLATROGK RPSKNLKARC
 SRKALHVNFK DMGWIDWITA PLEYEAFHCE GLCEFFLRSH LEPTINGAVIQ
 TLMNSMDPES TPPTCCVPIR LSPISILFID SANNVYKQY EDMVVEGCG
 R

oder ein Fragment davon ist.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei X eine kovalente Bindung ist. 20
5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei X ein Abstandshalter mit mindestens zwei reaktiven, zur Bindung an A und B befähigten Gruppen, ist.
6. Verbindung nach Anspruch 5, wobei die reaktiven Gruppen gleich oder unterschiedlich sind.
7. Verbindung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die reaktive Gruppe eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe, eine Hydroxylgruppe oder eine Sulfhydrylgruppe ist. 25
8. Verbindung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei der Abstandshalter X ein Oligopeptid ist oder eine Verbindung ist, die eine oder mehrere Einheiten mit 1–100 Kettenatomen umfaßt, wobei die Kettenatome unsubstituiert oder durch Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Alkyl-, und/oder cyclische oder heterocyclische Gruppen substituiert sind, und die Einheiten gegebenenfalls über Sauerstoff- und/oder Schwefel-Atome verbrückt ist.
9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei X sowohl eine oder mehrere kovalenten Bindungen als auch eine oder mehrere Abstandshalter nach einem der Ansprüche 5 bis 8, bedeutet. 30
10. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Anhanggruppe B ein Peptid ist.
11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Anhanggruppe B ein Peptid ist und mit seinem C-Terminus über eine Amidbindung an N-Terminus von A gebunden ist.
12. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Anhanggruppe B ein Peptid ist und der Abstandshalter X ein Oligopeptid ist, und das Peptid ist mit seinem C-Terminus über eine Amidbindung am N-Terminus des Oligopeptids gebunden ist und das Oligopeptid mit seinem C-Terminus über eine Amidbindung am N-Terminus von A gebunden ist. 35
13. Nukleinsäure, enthaltend mindestens eine für eine Verbindung von Anspruch 10, 11 oder 12 kodierende Nukleinsäuresequenz. 40
14. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure von Anspruch 13.
15. Wirtszelle, enthaltend eine Nukleinsäure von Anspruch 13 oder den Vektor von Anspruch 14.
16. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 10, 11 oder 12, umfassend die Schritte:
 - (a) Transformation geeigneter Wirtszellen mit einer Nukleinsäure von Anspruch 13 oder einem Vektor von Anspruch 14, 45
 - (b) Züchten der transformierten Wirtszellen unter für die Expression der Verbindung geeigneten Bedingungen in einem Kulturmedium, und
 - (c) Isolierung einer Verbindung aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturmedium.
17. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Anhanggruppe B eine Diphosphonsäure ist und mindestens eine zur Kopplung an A oder X befähigte, vorzugsweise endständige Gruppe enthält, oder ein Salz davon ist. 50
18. Verbindung nach Anspruch 17, wobei die Anhanggruppe B folgende Formel



umfaßt, worin der Rest R R1–C–R2 bedeutet, worin R1 eine Hydroxylgruppe, Aminogruppe, Halogengruppe, Carboxylgruppe, Sulfhydrylgruppe, Guanidiniumgruppe oder Wasserstoffgruppe bedeutet und R2 einen unsubstituierten oder durch C1–C20 Alkyl- und/oder Arylreste und/oder Kohlenhydratreste substituierten, linearen, verzweigt-kettigen, cyclischen oder heterocyclischen, gesättigten oder ungesättigten C1–20-Kohlenwasserstoffrest bedeutet. 55

19. Verbindung nach Anspruch 17, welche Alendronsäure, Clodronsäure, Pamidronsäure, Etidronsäure, Neridronsäure, Risedronsäure, Tiludronsäure, Mildronsäure, Aminohydroxy-Propylen-Diphosphonsäure, YM 175 oder BM-210995 ist. 60

20. Verbindung nach Anspruch 17, welche ein Derivat der Guanidinalkyl-1,1-diphosphonsäuren oder der heterocyclische Iminobismethyldiphosphonsäuren ist. 65

21. Verbindung nach Anspruch 17, welche ein Derivat der 1-Hydroxy-1,1-diphosphonsäuren ist.

22. Verbindung nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei die zur Kopplung an A oder X befähigte Gruppe eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe, Hydroxylgruppe oder Sulfhydrylgruppe ist.

23. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach den Ansprüchen 17 bis 22, wobei die Anhanggruppe B chemisch über eine kovalente Bindung an A gekoppelt wird.

24. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach den Ansprüchen 17 bis 22, wobei die Anhanggruppe B chemisch an den Abstandshalter X gekoppelt wird und/oder der Abstandshalter X chemisch an A gekoppelt wird.

25. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und 17 bis 22, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- und/oder Füllstoffen.

26. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder 17 bis 22, zur Vorbeugung oder lokalen oder systemischen Behandlung von Erkrankungen, die den Knorpel und/oder Knochen betreffen wie beispielsweise Osteoporose, Paget'sche Krankheit, Osteodystrophia, Osteoarthritis oder Osteoarthropathie und von Schädigungen des Knorpel- oder Knochengewebes verursacht durch Verletzung oder Überbelastung.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Figur 1

MRLPKLLTFL LWYLAULDLE FICTVLGAPD LGQRPQGTRP GLAKAEAKER PPLARNVFRP
GGHSYGGGAT NANARAKGGT GQTGGLTQPK KDEPKKLPPR PGGPEPKPGH PPQTRQATAR
TVTPKGQLPG GKAPPKAGSV PSSFLLKKAR EPGPPREPKE PFRPPPITPH EYMLSLYRTL
SDADRKGGS SVKLEAGLAN TITSFIDKGQ DDRGPVVRKQ RYVFDISALE KDGLLGAEIR
ILRKKPSDTA KPAAPGGGRA AQLKLSSCPS GRQPASLLDV RSVPGLDGSG WEVFDIWKLF
RNFKNSAQLC LELEAWERGR AVDLRGLGFD RAARQVHEKA LFLVFGRTKK RDLFFNEIKA
RSGQDDKTVY EYLFSQRRKR RAPLATRQ GK RPSKNLKARC SRKALHVNFK DMGWDDWIIA
PLEYEAFHCE GLCEFPLRSH LEPTNHAVIQ TLMNSMDPES TPPTCCVPTR LSPISILFID
SANNVVYKQY EDMVVESCGC R

Figur 2

CCATGGCCTCGAAAGGGCAGCGGTGATTTTTTTTACATAAATATATCGCACTTAAATGAG
TTTAGACAGCATGACATCAGAGAGTAATTAAATTGGTTTGGGTTGGAATTCCGTTTCCAA
TTCCTGAGTTCAGGTTTGTAAGATTTTTCTGAGCACCTGCAGGCCTGTGAGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGAAGTATTTTCACTGGAAAGGATTCAAACTA
GGGGGAAAAAAAAACTGGAGCACACAGGCAGCATTACGCCATTCTTCCTTCTTGGAAGAA
TCCCTCAGCCTTATACAAGCCTCCTTCAAGCCCTCAGTCAGTTGTGCAGGAGAAAGGGGG
CGGTTGGCTTTCTCCTTCAAGAACGAGTTATTTTTCAGCTGCTGACTGGAGACGGTGCAC
GTCTGGATACGAGAGCATTTCCACTATGGGACTGGATACAAACACACACCCGGCAGACTT
CAAGAGTCTCAGACTGAGGAGAAAGCCTTTCTCTGCTGCTACTGCTGCTGCCGCTGCT
TTTGAAAGTCCACTCCTTTCATGGTTTTTCTGCCAAACCAGAGGCACCTTTGCTGCTGC
CGCTGTTCTCTTTGGTGTCAATCAGCGGCTGGCCAGAGGATGAGACTCCCCAACTCCTC
ACTTCTTGTCTTTGGTACCTGGCTTGGCTGGACCTGGAATTCATCTGCACTGTGTTGGGT
GCCCCTGACTTGGGCCAGAGACCCCAGGGGACCAGGCCAGGATTGGCCAAAGCAGAGGCC
AAGGAGAGGGCCCCCTGGCCCGAACGTCTTCAGGCCAGGGGGTCACAGCTATGGTGGG
GGGGCCACCAATGCCAATGCCAGGGCAAAGGGAGGCACCGGGCAGACAGGAGGCCTGACA
CAGCCCAAGAAGGATGAACCCAAAAGCTGCCCCCAGACCGGGCGGCCCTGAACCCAAG
CCAGGACACCCCTCCCCAAACAAGGCAGGCTACAGCCCGGACTGTGACCCCAAGGACAG
CTTCCCGGAGGCAAGGCACCCCCAAAAGCAGGATCTGTCCCCAGCTCCTTCTGCTGAAG
AAGGCCAGGGAGCCCGGGCCCCCACGAGAGCCCAAGGAGCCGTTTCGCCCACCCCCATC
ACACCCACGAGTACATGCTCTCGCTGTACAGGACGCTGTCCGATGCTGACAGAAAGGGA
GGCAACAGCAGCGTGAAGTTGGAGGCTGGCCTGGCCAACACCATCACCAGCTTTATTGAC
AAAGGGCAAGATGACCGAGGTCCCGTGGTCAGGAAGCAGAGGTACGTGTTTGACATTAGT
GCCCTGGAGAAGGATGGGCTGCTGGGGGCGAGCTGCGGATCTTGCGGAAGAAGCCCTCG
GACACGGCCAAGCCAGCGGCCCCCGAGGCGGGCGGGCTGCCAGCTGAAGCTGTCCAGC
TGCCCCAGCGGCCGGCAGCCGGCCTCCTTGCTGGATGTGCGCTCCGTGCCAGGCCTGGAC
GGATCTGGCTGGGAGGTGTTTCGACATCTGGAAGCTCTTCCGAACTTTAAGAACTCGGCC
CAGCTGTGCCTGGAGCTGGAGGCCTGGGAACGGGGCAGGGCCGTGGACCTCCGTGGCCTG
GGCTTCGACCGCGCCGCCCCGGCAGGTCCACGAGAAGGCCCTGTTCTTGGTGTGTTGGCCGC
ACCAAGAAACGGGACCTGTTCTTTAATGAGATTAAGGCCCGCTCTGGCCAGGACGATAAG

Fortsetzung Figur 2

ACCGTGTATGAGTACCTGTTTCAGCCAGCGGCGAAAACGGCGGGCCCCACTGGCCACTCGC
CAGGGCAAGCGACCCAGCAAGAACCCTTAAGGCTCGCTGCAGTCGGAAGGCACTGCATGTC
AACTTCAAGGACATGGGCTGGGACGACTGGATCATCGCACCCCTTGAGTACGAGGCTTTC
CACTGCGAGGGGCTGTGCGAGTTCCCATTTGCGCTCCACCTGGAGCCCACGAATCATGCA
GTCATCCAGACCCTGATGAACTCCATGGACCCCGAGTCCACACCACCCACCTGCTGTGTG
CCCACGCGGGCTGAGTCCCATCAGCATCCTCTTCATTGACTCTGCCAACAACGTGGTGTAT
AAGCAGTATGAGGACATGGTCGTGGAGTCGTGTGGCTGCAGGTAGCAGCACTGGCCCTCT
GTCTTCCTGGGTGGCACATCCCAAGAGCCCCCTTCCTGCACTCCTGGAATCACAGAGGGGT
CAGGAAGCTGTGGCAGGAGCATCTACACAGCTTGGGTGAAAGGGGATTCCAATAAGCTTG
CTCGCTCTCTGAGTGTGACTTGGGCTAAAGGCCCCCTTTTATCCACAAGTTCCCCTGGCT
GAGGATTGCTGCCCCGTCTGCTGATGTGACCAGTGGCAGGCACAGGTCCAGGGAGACAGAC
TCTGAATGGGACTGAGTCCCAGGAAACAGTGCTTTCCGATGAGACTCAGCCCACCATTTTC
TCCTCACCTGGGCCTTCTCAGCCTCTGGACTCTCCTAAGCACCTCTCAGGAGAGCCACAG
GTGCCACTGCCTCCTCAAATCACATTTGTGCCTGGTGA CTTCCTGTCCCTGGGACAGTTG
AGAAGCTGACTGGGCAAGAGTGGGAGAGAAGAGGAGAGGGCTTGGATAGAGTTGAGGAGT
GTGAGGCTGTTAGACTGTTAGATTTAAATGTATATTGATGAGATAAAAAGCAAACTGTG
CCT